霉菌 α-半乳糖苷酶分解棉子糖的初步研究

I. 菌株的分离筛选

黑龙江省应用微生物研究所酶制剂组
（哈 尔 滨）

甜菜含棉子糖较多。棉子糖占糖蜜总糖量的比数虽较小，但却导致蔗糖结晶难以析出而产生大量废糖蜜，造成废糖蜜含蔗糖量高达45—50%。所以，棉子糖是甜菜制糖工艺中重要有害物质之一。对此曾采用过化学处理方法，但因工艺复杂，成本较高，尚难消除其不良作用。

棉子糖被蔗糖酶分解产生蜜二糖和果糖；被α-半乳糖苷酶分解产生半乳糖和蔗糖。若用α-半乳糖苷酶（即蜜二糖酶）水解废糖蜜中的棉子糖，则能消除该糖阻碍蔗糖析出结晶的作用。而且分解一分子棉子糖就多产生一分子蔗糖，使蔗糖产量能较大幅度增加，又能提高蔗糖质量。

很多微生物能产生α-半乳糖苷酶[1—3]。铃木等人曾筛选出只产α-半乳糖苷酶不产蔗糖酶的放线菌和产α-半乳糖苷酶较高产蔗糖酶较少的葡酒色被孢霉（*Mortierella vinacea*），并将后者应用于甜菜制糖工艺中，效果良好，称之"无废糖蜜制糖法"[1,4,5]。

放线菌目（Actinomyceteales）的微生物较难利用蔗糖[6,7]，链霉菌属（*Streptomyces*）不能利用蔗糖的菌株较多，有的能以棉子糖做唯一碳源，并将其分解成蔗糖。因此，铃木等人筛选了三株放线菌，并提出了以在蔗糖鉴定培养基上生长与否来分离筛选菌株的方法[1]。

Lilly 和 Barnett 的广泛研究指出：棉子糖可被大多数真菌所利用，但不能利用它的菌亦非罕见[8]。真菌酶类对棉子糖的水解作用一般应该是归因于蔗糖酶[9,10]。Lilly 和 Barnett 研究的57种真菌，只有四种完全不能利用蔗糖，而有几种在蔗糖中可缓慢地生长[6]。在几种主要类型的真菌中，不利用蔗糖者，似乎在壶菌目（Chytridiales）和毛霉目（Mucorales）中较普遍[11]。

因多数真菌能利用蔗糖，从中筛选产α-半乳糖苷酶活性较高，而产蔗糖酶较低的菌株是比较困难的。因此，须采取适宜的分离筛选方法。目前尚未见关于分离筛选产α-半乳糖苷酶真菌的方法。

为了以固定化细胞的形式应用于甜菜制糖工业中，以分离筛选产胞内α-半乳糖苷酶活性较高、产蔗糖酶较低，能积累蔗糖的菌株为原则，我们研究了定性纸层析分离筛选产α-半乳糖苷酶真菌的方法。以此法从我国南方土壤中分离筛选出396-1和973-1两株产α-半乳糖苷酶活性较高而产部分蔗糖酶的霉菌。

菌株的分离筛选方法

一、菌株的分离

（一）分离方法

用以棉子糖做唯一碳源的培养基，制备平板，以土壤悬浮液涂布接种，于30℃培养3—4天，挑取生长良好的菌落少许，移接于乳糖做碳源的斜面培养基上培养5—6天，选生长良好的菌株纯化后备用。

（二）培养基

1. 平板分离培养基（克）：NH_4NO_3 3.0，K_2HPO_4 1.0，KCl 0.5，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01，蛋白胨0.2，棉子糖10.0，琼脂20.0；蒸馏水1,000毫升，1%孟加拉红3毫升，pH

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

5.5—6.0。

灭菌后加入 1 %链霉素溶液 3 毫升。

2. 乳糖斜面培养基（克）：NH_4NO_3 3.0，K_2HPO_4 1.0，KCl 0.5，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01，蛋白胨 0.2，乳糖 10.0、琼脂 20.0，蒸馏水 1,000 毫升，pH 5.5—6.0。

二、菌株的初筛

（一）液体振荡培养

将分离的菌株斜面移接于大试管棉子糖培养液中，30℃ 下振荡（180 次/分）培养 72 小时。棉子糖培养液组成（克）是：KH_2PO_4 8.17，Na_2HPO_4 2.18，KCl 0.5，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01，蛋白胨 3.0，牛肉膏 3.0，棉子糖 10.0；蒸馏水 1,000 毫升，pH 6.0。

（二）棉子糖、蔗糖纸层析定性测定

将上述培养液滤除菌体，滤液置于沸水浴中，处理 10 分钟灭酶活，在层析滤纸上点样，以正丁醇：吡啶：水（6:4:3）系统为溶媒展开，用 1% α-萘酚乙醇溶液和 10%磷酸溶液的等量混合液为显色剂喷雾，置于 105℃烘箱中处理 10 分钟显色，将有较大蔗糖斑点而无棉子糖（或略有）斑点之试样的对应菌株供复筛。

三、菌株的复筛

（一）液体振荡培养

将初筛的菌株移接于装 50 毫升棉子糖培养液的 250 毫升三角瓶中，振荡培养，其它条件同初筛。

（二）α-半乳糖苷酶的测定

1. 酶液的制备：将三角瓶中的培养液过滤，菌丝体用蒸馏水充分洗涤后，置于乳钵中加少量经预处理的金刚砂研磨使菌丝体破碎，加入与培养液等量的蒸馏水，静置后其澄清液即为胞内酶液。

2. 酶反应液的制备：取 0.06*M* 蜜二糖水溶液 20 毫升，0.1*M* 磷酸盐缓冲液（pH 5.2）20 毫升，胞内酶液 40 毫升于 250 毫升三角瓶中。对照组则加入经沸水浴 10 分钟灭活的胞内酶液 10 毫升。二者同时置于 40℃振荡恒温水浴中，反应两小时，将前者置于沸水浴中处理 10 分钟终止反应。

3. 酶活力测定：以 Warburg 氏压力计法用葡萄糖氧化酶测定上述蜜二糖水解液所产生的葡萄糖量。

在上述制备酶反应液的条件下，分解蜜二糖产生一微克葡萄糖的酶量，为一个单位的 α-半乳糖苷酶。

（三）蔗糖酶的测定

用 *M*/15 磷酸盐缓冲液（pH 7.0）制备的 30% 蔗糖溶液 1 毫升、胞内酶液 1 毫升和甲苯 1 毫升，混合后置于 37℃ 水浴中反应 24 小时。分解产生的转化糖用 Somogyi-Nelson 法，以分光光度计测定。

蔗糖酶的一个单位为：在上述反应条件下产生 1 毫克转化糖的蔗糖酶量。

结果与讨论

1. 作者曾采用铃木等人分离筛选方法，从 800 余个我国南方森林和荒地土样中，筛选出 7 株在蔗糖鉴定培养基上生长微弱的真菌，但其在棉子糖培养基上亦生长不佳，产 α-半乳糖苷酶活性也很低。我们认为产 α-半乳糖苷酶的真菌，对碳源的利用可能不是单酶系统而是多酶系统的作用，虽然在蔗糖鉴定培养基上能生长，但仅是利用蔗糖做碳源而已，并非蔗糖酶活性亦高。因此，以蔗糖作为鉴别培养基对于 α-半乳糖苷酶活性高、蔗糖酶活性较低的菌株可能会被遗漏掉。

2. 应用定性纸层析分离筛选产 α-半乳糖苷酶真菌的方法，于 1974 年初从 200 余个土样中，筛选出 19 株产 α-半乳糖苷酶的真菌。用棉子糖液体振荡培养的滤液，并做定性纸层析试验，其层析谱表明：19 株菌均具有分解棉子糖而积累蔗糖的特性。

3. 初筛的 19 株菌，α-半乳糖苷酶活力测定复筛试验结果表明：所有菌株均能程度不同地产生胞内 α-半乳糖苷酶。其中以 396-1 和 973-1 两株菌产酶活性为最高。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

4. 将 19 株菌接种在蔗糖鉴定培养基上，均可生长。396-1 霉菌的蔗糖酶活力测定复筛试验结果表明：该菌产部分蔗糖酶。

根据上述结果，我们认为：定性纸层析分离筛选产 α-半乳糖苷酶真菌的方法是比较有效的方法。

396-1 霉菌的微生物学特性，将于以下各报中报道。

参 考 文 献

[1] 铃木英雄ら：工業技術院发酵研究所研究报告，No. 28，1965。

[2] Imanaka, T., T. Kaieda, K. Sato and H. Taguhi: *J. Ferment. Technol.*, 50:633, 1972.

[3] Dey, P. M. and J. B. Pridham: *Advan. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 36:91, 1972.

[4] Suzuki, H., Y. Ozawa, H. Oota and H. Yoshida: *Agr. Biol. Chem.*, 33:506, 1969.

[5] 上林明：发酵協会誌，27:337，1969.

[6] Bendict, R. G., L. A. Lindenfesr, F. H. Stodo and D. H. Traufler: *J. Bacteriol.* 62:487, 1951.

[7] Waksman, S. A.: *Soil Sci.*, 8:71—215, 1919.

[8] Lilly, V. G. and H. L. Barntt: *West Va. Univ. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 362:5—58, 1953.

[9] Amelung, H. Z.: *Physiol. Chem.*, 187:171, 1930.

[10] Bealing, F. J.: *Biochem. J.*, 55:93—101, 1953.

[11] Satina, S. and A. F. Blakeslee: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 14:229—235, 1928.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn